



U.S. PAT.  
09/459573  
12/13/99



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ  
(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

рег. No 20/14-142

01 апреля 1999 г

### СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности Российского Агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение N 99104431, поданной в марте месяце 09 дня 1999 года.

**Название изобретения:** Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*, определяющий повышенную продукцию аминокислот (варианты), и способ получения L-аминокислот.

**Заявитель (и):** Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГНИИ генетика).

<b>Действительный автор(ы):</b>	ЛИВШИЦ Виталий Аркадьевич	RU,
	ЗАКАТАЕВА Наталия Павловна	RU,
	НАКАНИШИ Казуо	JP,
	АЛЕШИН Владимир Веняминович	RU,
	ТРОШИН Петр Владимирович	RU,
	ТОКМАКОВА Ирина Львовна	RU.

Уполномоченный заверить копию  
заявки на изобретение

Г.Ф.Востриков  
Заведующий отделом

99104431

МПК<sup>6</sup> C12 N /20

C12 P 13/06

C12 P 13/08

ФРАГМЕНТ ДНК ИЗ *ESCHERICHIA COLI*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПОВЫШЕННУЮ  
ПРОДУКЦИЮ АМИНОКИСЛОТ (ВАРИАНТЫ), И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

L-АМИНОКИСЛОТ

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и, в частности, касается способа получения L-аминокислот, а именно, L-глутаминовой кислоты, L-лизина, L-треонина, L-аланина, L-гистидина, L-пролина, L-аргинина, L-валина, или L-изолейцина с помощью бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*.

Для получения аминокислот с помощью ферментации используются штаммы, выделенные из природных источников, или с целью увеличения продуктивности применяют специально полученные мутанты этих штаммов. В случае L-лизина, например, известно много искусственных мутантов, продуцирующих эту аминокислоту. Большинство из них – это мутанты бактерий, устойчивые к S-2-аминоэтилцистеину, (АЭЦ) принадлежащие к родам *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* или *Escherichia*. Предложено много различных приемов для повышения продукции аминокислот, например, таких как трансформация рекомбинантными ДНК (Патент США 4,278,765). Эти приемы в большинстве случаев основаны на повышении активности ферментов, участвующих в биосинтезе аминокислоты, и/или в придании ключевому ферменту нечувствительности к ингибирующему действию конечного продукта и т.п. (См. Выложенную заявку на патент в Японии No. 56-18596 (1981) и международную заявку WO No.95/16042)

С другой стороны, как пример повышения продуктивности штамма-продуцента аминокислоты путем увеличения экскреции этой аминокислоты известен штамм, принадлежащий к роду *Corynebacterium*, у которого повышена активность гена экскреции лизина, *lysE* (Vrljic et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996). Однако в отношении бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, наличие белков, обеспечивающих экскрецию этой или какой-либо другой аминокислоты, остается неизвестным. Поэтому не известно также, может ли повышение активности белка экскреции повысить продукцию аминокислоты в случае бактерий принадлежащих к роду *Escherichia*.

Хотя на сегодня известна нуклеотидная последовательность всей хромосомы штамма *Escherichia coli* K-12, принадлежащего к роду *Escherichia* (Science, 227, 1453-1474, 1997), имеется большое генов, кодирующих трансмембранные белки, функция которых остается неизвестной. Среди них могут быть и белки, участвующие в процессе транспорта аминокислот из клеток бактерий.

Задачей настоящего изобретения является повышение продуктивности штаммов-продуцентов L-аминокислот и разработка на этой основе нового способа получения L-аминокислот биотехнологическим методом.

Поставленную задачу решают путем выявления генов, контролирующих синтез белков, участвующих в экскреции L-аминокислот у *E. coli*, и конструирования на их основе штаммов-продуцентов, позволяющих разработать способ получения L-аминокислот, а именно L-глутаминовой кислоты, L-лизина, L-треонина, L-аланина, L-гистидина, L-пролина, L-аргинина, L-валина, или L-изолейцина с повышенным выходом целевой аминокислоты.

Предметом настоящего изобретения являются бактерии (в дальнейшем рассматриваемые как “бактерии по настоящему изобретению”), принадлежащие к роду

*Escherichia*, обладающие способностью к продукции аминокислот, у которых эта способность повышена в результате увеличения экспрессируемого количества, по крайней мере, одного из белков, принадлежащих к группе состоящей из следующих белков, поименованных в пунктах от А по Н:

А – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 5 (Фиг. 1);

В – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №5, и который имеет активность, обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот;

С – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 6 (Фиг.2);

Д – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №6, и который имеет активность, обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот;

Е. – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 7 (Фиг.3);

Ф – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №7, и который имеет активность, обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот;

Г – белок, который состоит из аминокислотной последовательности № 8 (Фиг.4);

Н – белок, который состоит из аминокислотной последовательности, включающей также делеции, замены, вставки или добавки из одной или нескольких аминокислот к последовательности №8, и который имеет активность, обеспечивающую бактериям, содержащим этот белок, повышенную продукцию L-аминокислот.

Бактериями по настоящему изобретению являются: продуценты L-аминокислот, относящиеся к роду *Escherichia*, а именно: продуценты L-лизина, у которых

экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков, поименованных в п.п. А по D и G и H увеличено; продуценты L-глутаминовой кислоты, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков, поименованных в п.п. А по H увеличено; продуценты L-аланина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. С и D увеличено; продуценты L-валина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. С и D увеличено; продуценты L-пролина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. А по F увеличено; :продуценты L-треонина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. Е и F увеличено; продуценты L-гистидина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. С по F увеличено; продуценты L-аргинина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков, поименованных в п.п. G и H увеличено; продуценты L-изолейцина, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы , состоящей из белков поименованных в п.п. С и D, увеличено.

В клетках бактерий по настоящему изобретению число копий ДНК, кодирующих указанные белки, может быть увеличено. Указанная ДНК в клетках этих бактерий преимущественно находится на многокопийном векторе или на транспозоне.

Настоящее изобретение также защищает способ получения аминокислот, который включает этапы:

- культивирования бактерий, полученных в соответствии с настоящим изобретением, и обладающих способностью к повышенной продукции аминокислот, в культуральной среде, обеспечивающей продукцию и накопление соответствующей аминокислоты в этой среде, и
- выделения накопившейся аминокислоты из этой среды.

Этот способ получения аминокислот включает получение L-лизина с помощью бактерий, продуцирующих L-лизин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. А по D и G, Н увеличено; получение L-глутаминовой кислоты с помощью бактерий, продуцирующих L-глутаминовую кислоту, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. А по Н увеличено; получение L-треонина с помощью бактерий, продуцирующих L-треонин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. Е и F увеличено; получение L-аланина с помощью бактерий, продуцирующих L-аланин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.п. С и D увеличено; получения L-пролина с помощью бактерий, продуцирующих L-пролин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.п. А по F увеличено; получение L-валина с помощью бактерий, продуцирующих L-валин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков поименованных в п.п. С и D увеличено; получение L-изолейцина с помощью бактерий, продуцирующих L-изолейцин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. С и D увеличено; получения L-гистидина помощью бактерий,

продуцирующих L-гистидин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. С по F, увеличено; получения L-аргинина помощью бактерий, продуцирующих L-аргинин, у которых экспрессируемое количество по крайней мере одного из белков, выбранных из группы, состоящей из белков, поименованных в п.п. G и H увеличено.

Примеры, представленный в настоящем изобретении, касаются тех случаев когда экспрессируемое количество белков увеличено за счет увеличения числа копий ДНК, кодирующих в клетках указанные белки.

В соответствии с настоящим изобретением способность продуцировать L-аминокислоты бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia*, может быть усилена, а способ получения аминокислот может быть усовершенствован в том, что касается повышения продукции аминокислот.

Ниже следует детальное объяснение настоящего изобретения. В дальнейшем изложении, если не оговорено, имеются в виду L-стереоизомеры аминокислот.

#### 1. Бактерии по настоящему изобретению.

Бактерии по настоящему изобретению представлены бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia* и способными к продукции аминокислот, у которых эта способность повышена за счет повышения экспрессируемого количества белков, обладающих активностью, которая обеспечивает увеличенную продукцию аминокислот. В дальнейшем эти белки будут обозначены как «белки, экскретирующие аминокислоты», однако этот термин не означает, что функция указанных белков ограничивается только экскрецией аминокислот. Примером белков, экскретирующих аминокислоты, являются белки, имеющие аминокислотные последовательности, представленные на Фиг.1 (последовательность No.5), Фиг.2 (Последовательность No.6), Фиг.3 (Последовательность No.7) и Фиг.4 (Последовательность No.8). Белки, экскретирующие аминокислоты, могут иметь специфичность по отношению к

определенным аминокислотам. Эта специфичность может быть определена путем экспрессии соответствующих белков в клетках бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, и установления факта повышения минимально ингибирующих концентраций определенных аминокислот, или аналогов аминокислот. Кроме того, специфичность может быть определена путем экспрессии соответствующих белков в клетках указанных бактерий, обладающих способностью к продукции аминокислот, и установления факта повышения продукции этих аминокислот.

Например, в случае лизина, белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6 или 8 обнаружил такого рода активность. В случае глутаминовой кислоты белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6, 7 или 8, обнаруживает такого рода активность. В случае треонина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 7, обнаруживает такого рода активность. В случае аланина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае валина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае изолейцина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6, обнаруживает такого рода активность. В случае гистидина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 6 и 7, обнаруживает такого рода активность. В случае пролина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 5, 6 или 7, обнаруживает такого рода активность. В случае аргинина белок, имеющий последовательность, показанную в списке последовательностей под номером 8, обнаруживает такого рода активность.



Термин «экспрессируемое количество увеличено» используется в настоящем изобретении для обозначения того факта, что экспрессируемое количество белка больше чем в исходных штаммах (штаммах «дикого типа»), например, в штамме *E. coli* MG1655 или *E. coli* W3110. Этот термин означает также, что если штамм получен путем генетической модификации, например, с помощью методов генной инженерии и т.п., то экспрессируемое количество белка повышается в результате этой модификации. Экспрессируемое количество белка экскретирующего аминокислоту может быть прямо определено путем измерения количества белка, экскретирующего аминокислоту, или косвенно по эффекту этого белка на устойчивость бактерий рода *Escherichia* к аминокислотам и к аналогам аминокислот.

Способ повышения экспрессируемого количества белка, экскретирующего аминокислоту, включает методы, предполагающие увеличение числа копий ДНК, кодирующих этот белок. Для увеличения числа копий ДНК фрагмент ДНК, кодирующий указанный белок, лигируют с вектором, который может функционировать в бактериях, принадлежащих к роду *Escherichia*, с образованием рекомбинантной ДНК, которой затем трансформируют клетки бактерии-хозяина. При этом число копий гена, кодирующего белок экскретирующий аминокислоту (гена белка экскретирующего аминокислоту) в клетках трансформированных бактерий увеличивается, и таким образом повышается экспрессируемое количество белка экскретирующего аминокислоту. Для этой цели можно использовать многокопийный вектор.

Кроме того, повышение экспрессируемого количества белка экскретирующего аминокислоту, может быть достигнуто введением множества копий гена белка экскретирующего аминокислоту, в хромосому бактерии-хозяина. Это введение в хромосому бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, может быть осуществлено посредством гомологической рекомбинации с использованием в качестве мишеней последовательностей ДНК, множество копий которых существует в хромосоме. В

качестве таковых могут быть использованы повторяющиеся последовательности в хромосомной ДНК и обращенные повторы транспозируемых элементов. Альтернативный метод предполагает введение в хромосомную ДНК множества копий гена белка секретирующего аминокислоту, с помощью интеграции его в транспозон и последующей индукции множественных актов транспозиции, как это описано в Выложенной заявке на патент в Японии No. 2-109985 (1990). В результате осуществления любого из описанных выше подходов число копий гена белка секретирующего аминокислоту, увеличится и тем самым увеличится экспрессируемое количество белка секретирующего аминокислоту.

Мультикопийные вектора могут представлены плазмидными векторами, такими как pBR322, pMW118, pUC19 или подобными, или фаговыми векторами, такими как  $\lambda$  1059,  $\lambda$ BF 101, M13mp9 или подобными. Транспозоны могут быть представлены фагом Mu, транспозонами Tn10, Tn5 или подобными. Введение ДНК в бактерии, принадлежащие к роду *Escherichia*, может быть осуществлено, например, с помощью метода Моррисона (Methods in Enzymology., 68, 326, 1979) или метода, в котором реципиентные клетки бактерий подвергают воздействию хлористого кальция для увеличения их проницаемости по отношению к ДНК (Mandel and Higa, J. Mol. Biol., 53, 159, 1970) или другими подобными методами.

Кроме упомянутой выше амплификации генов, экспрессируемое количество белка секретирующего аминокислоту, может быть увеличено также путем замены экспрессирующей регуляторной последовательности, такой как промотор гена белка, секретирующего аминокислоту на более сильный промотор (Выложенная заявка на патент в Японии No.1-215280 (1989)). В качестве сильных промоторов известны lac-промотор, trp-промотор, tac-промотор, P<sub>R</sub>-промотор и P<sub>L</sub>-промотор фага ламбда и другие. Замена промотора усиливает экспрессию гена белка секретирующего аминокислоту, и тем самым увеличивает экспрессируемое количество указанного

белка. Усиление экспрессирующей регуляторной последовательности можно совмещать с увеличением числа копий гена белка экскретирующего аминокислоту.

В бактериях по настоящему изобретению, может быть повышено экспрессируемое количество нескольких белков экскретирующих аминокислоты.

Белки экскретирующие аминокислоты, кодируются известными генами (открытыми рамками считывания, ORF) yahN, yeaS, yfiK, yggA, функция которых не известна. Поэтому ДНК, кодирующие белки экскретирующие аминокислоты, могут быть получены путем синтеза праймеров на основе известных последовательностей (например, полной нуклеотидной последовательности хромосомы *Escherichia coli* K-12, (Science, 277, 1453-1474, 1997)) и амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием хромосомной ДНК бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, в качестве матрицы. Кроме того, нужный фрагмент ДНК может быть отобран с помощью гибридизации из библиотеки генов хромосомной ДНК указанных бактерий путем применения зонда, изготовленного на основе известной последовательности. Альтернативный подход предполагает синтез ДНК гена, кодирующего белок экскретирующий аминокислоту, на основе известной последовательности. Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК кодирующих белки YahN, YeaS, YfiK и YggA, экскретирующие аминокислоты, представлены в формуле изобретения (Последовательности No.1 - 4).

Методы выделения хромосомной ДНК, получения библиотеки генов, ДНК-ДНК гибридизации, ПЦР, выделения и трансформации плазмидной ДНК, рестрицирования и лигирования ДНК, выбора нуклеотидов для праймеров, и т.п. методы хорошо известны и детально описаны во многих руководствах, например, Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Белки экскретирующие аминокислоты, могут содержать делеции, замены, инсерции или добавки в одну или несколько аминокислот в одной или нескольких позициях, не нарушающих при этом активность белка, обеспечивающую повышенную устойчивость к аминокислотам и/или аналогам и повышенную продукцию аминокислот. Термин «несколько» может варьировать в зависимости от положения в пространственной структуре белка, или характера аминокислотного остатка. Это связано с тем, что некоторые аминокислоты, такие, например, как изолейцин и валин, имеют высокое сходство друг с другом, и различие между этими аминокислотами заметно не влияет на пространственную структуру белка. Поэтому может существовать белок, который имеет гомологию не менее 70%, а предпочтительнее, не менее 90% по отношению ко всей аминокислотной последовательности белка экскретирующего аминокислоту, и который обладает активностью, повышающей способность к продукции аминокислот бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia* и содержащими этот белок. В частности, «несколько» может соответствовать числам от 20 до 60, но преимущественно от 2 до 20.

Фрагменты ДНК, кодирующие по существу те же белки, что и белки экскретирующие аминокислоты, описанные выше, могут быть получены, например, путем модификации нуклеотидной последовательности, в частности при помощи сайт-направленного мутагенеза, так что один или более аминокислотный остаток будет делетирован, заменен, вставлен или добавлен. ДНК, модифицированная описанным выше способом, может быть получена известными методами с помощью мутационных воздействий. Мутационная обработка включает методы обработки ДНК, кодирующей белок экскретирующий аминокислоту, *in vitro*, например, при помощи гидроксилamina, или методы обработки микроорганизма, в частности, бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* и несущих ДНК, кодирующую белок экскретирующий аминокислоту, УФ облучением или мутагенными агентами, такими как N-метил-N'-нитро-N-

нитрозогуанидин (НГ) или азотистая кислота, которые обычно используются для индукции мутаций.

Фрагменты ДНК, кодирующие указанные варианты белков экскретирующих аминокислоты, отбирают путем экспрессии в клетках бактерий рода *Escherichia* плазмидной ДНК, несущей ген, кодирующий указанный белок, и подвергнутой *in vitro* мутагенному воздействию, как описано выше, с последующим определением их устойчивости к высокой концентрации аминокислоты и/или аналога аминокислоты и/или способности повышать продукцию аминокислоты.

Изобретение относится также к вариантам белков экскретирующих аминокислоты, которые встречаются в разных видах, штаммах и вариантах бактерий рода *Escherichia* и обусловлены природным разнообразием. ДНК, кодирующих эти варианты, и которые гибридизуются в жестких условиях с ДНК, имеющими нуклеотидные последовательности с 1 по 4, показанные в формуле изобретения.

Термин «жесткие условия» означает здесь условия, при которых так называемая специфическая гибридизация происходит, а неспецифическая не происходит. Трудно четко выразить эти условия с помощью каких-то цифровых значений. Однако, например, жесткие условия включают условия, при которых ДНК, имеющие высокую гомологию, например, не менее 70% гомологии по отношению друг к другу гибридизуются, а ДНК, имеющие гомологию ниже указанной величины не гибридизуются, (условия отмывки при гибридизации по Саузерну: 60 °C, растворами 1xSSC, 0.1% SDS, или, предпочтительнее, растворами 0.1xSSC, 0.1% SDS, которые являются обычными условиями при гибридизации по Саузерну).

Среди отобранных таким образом генов могут встречаться гены с появившимся в их средней части стоп-кодоном, или гены, кодирующие белок, который утратил активность в результате мутации в активном центре. Такие дефектные гены легко элиминируются после лигирования их с коммерчески доступными экспрессионными

векторами и определения способности повышать устойчивость к аминокислотам или аналогам, или повышать продукцию аминокислот бактериями, принадлежащими к роду *Escherichia*, как это описано выше.

Термин “ДНК, кодирующая белок”, обозначает двунитевую ДНК, одна из нитей которой кодирует белок.

Увеличив экспрессируемое количество белка экскретирующего аминокислоту в клетках штамма-продуцента, как это описано выше, можно повысить продукцию соответствующей аминокислоты. При этом возможны два варианта:

1. Признак повышенного экспрессируемого количества белка экскретирующего аминокислоту вводят в штамм, уже способный продуцировать желаемую аминокислоту.
2. Способность к продукции аминокислот придается штаммам, у которых экспрессируемое количество белка экскретирующего аминокислоту уже повышено.

Примеры бактерий, продуцирующих аминокислоты и принадлежащих к роду *Escherichia*, приведены ниже.

#### Продуцент глутаминовой кислоты.

В качестве продуцента глутаминовой кислоты может быть представлен штамм *E. coli* AJ13199 (Патент Франции No.2747689).

#### Лизин –продуцирующие бактерии

Продуцент лизина, принадлежащий к роду *Escherichia*, может быть представлен штаммом *E. coli* W3110 (tyrA) (Европейский патент No.488424), в который введена плазмида pCABD2 (Международная заявка WO 95/16042). Штамм W3110 (tyrA) был сконструирован следующим образом. Штамм *E. coli* W3110, который хранится в Национальном Институте Генетики (Япония) высевали на чашку с LB-агаром, содержащим стрептомицин, и отбирали стрептомицин-устойчивый мутант. Клетки

смешивали с клетками штамма *E.coli* K-12 ME8424, и подрачивали в L-бульоне (состав: 1% бактотриптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.5% NaCl), при 37°C в течение 15 минут для индукции конъюгации. Штамм *E.coli* K-12 ME8424 имеет следующие генетические характеристики (*HfrPO45*, *thi*, *relA1*, *tyr::Tn10*, *ung-1*, *nadB*) и хранится в Национальном Институте Генетики (Япония). Затем, высевая эту суспензию бактерий на полноценную питательную среду (агаризованный L-бульон, содержащий стрептомицин, тетрациклин и тирозин), получили штамм *E.coli* W3110 (*tyrA*). Плазмида pCABD2 может быть получена интеграцией фрагмента, содержащего ген *ddh* и фрагмента, содержащего ген *dapB*, которые амплифицировали из хромосомы *E.coli* W3110 на основе известной последовательности, в плазмиду RSED80. Штамм *E.coli*, несущий плазмиду RSFD80, депонирован в Национальном Институте Биологических Наук и Гуманитарных Технологий Агентства Промышленной Науки и Технологии (Япония) 28 октября 1993 года под номером FERM P-13936, откуда он передан в международный депозитарий по Будапештскому договору от 1 ноября 1994 года и получил номер хранения FERM BP-4859.

Кроме того, в качестве продуцента лизина, принадлежащего к роду *Escherichia*, используют штамм *E. coli* VL614. Этот штамм является производным известного штамма VL613 (Авторское свидетельство СССР No.1354458). Штамм VL613, в свою очередь, получен на основе известного штамма Gif 102 (Theze, J. and Saint Girons. J.Bacteriol., 118, 990-998, 1974) в три этапа. На первом этапе был получен мутант этого штамма, устойчивый к 2 мг/мл S(2-аминоэтил)-L-цистеина. На втором этапе с помощью трансдукции фагом P1 в этот штамм были введены гены, связанные с усвоением сахарозы, локализующиеся на транспозоне Tn2555 (Дорошенко и др., Молекулярная биология, 22, 645-6586 1988). Так был получен штамм VL612. На третьем этапе, мутация *rhtA23*, сообщающая клеткам устойчивость к высоким концентрациям треонина и гомосерина (ABSTRACTS of 17<sup>th</sup> International Congress of

Biochemistry and Molecular Biology in conjunction with 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, №457), была введена в клетки штамм VL612 из штамма ВКПМ В-3996 (Патент США No. 5175107) с помощью трансдукции фагом P1. Трансдуктант, отобранный по устойчивости к 10 мг/мл гомосерина обозначен как штамм VL613. Штамм VL614 получают трансдукцией с помощью фага P1 в этот штамм дикого аллеля гена *rhtA*, сцепленного с транспозоном Tn10, из штамма ВКПМ В-6204 (*zbi-3058::Tn10*). Трансдуктанты отбирают на среде LB с тетрациклином (10 мг/л) и среди них находят клоны, чувствительные на минимальной среде к гомосерину (10 г/л), (т.е.получившие *rhtA*<sup>+</sup> аллель).

#### Треонин –продуцирующие бактерии

Продуцент треонина, принадлежащий к роду *Escherichia*, может быть представлен штаммом VL2054. Этот штамм является производным известного штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 (Патент США No. 5 175 107), и получен на его основе в два этапа. Сначала из штамма *E. coli* ВКПМ В-3996 элиминируют плазмиду pVIC40. В полученный бесплазмидный реципиент с помощью фага P1 трансдуцируют сцепленный с транспозоном Tn10 дикий аллель гена *rhtA*, связанный с устойчивостью к гомосерину и треонину из штамма ВКПМ В-6204 (*zbi-3058::Tn10*). Трансдуктанты отбирают на среде LB с тетрациклином (10 мг/л) и среди них находят клоны, чувствительные на минимальной среде к 10 г/л гомосерина, (т.е.получившие *rhtA*<sup>+</sup> аллель). Затем известным методом получают мутацию, повреждающую ген *kan* транспозона Tn5, интегрированного в ген *tdh*. В результате штамм становится чувствительным к канамицину, но ген *tdh* остается инактивированным.

На втором этапе в интегративный вектор миниMu (Mud) клонируют гены треонинового оперона из плазмиды pVIC40 под P<sub>R</sub>-промоторм фага ламбда и ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу. Полученную конструкцию известным методом



(Патент США No. 5595889) интегрируют в штамм *E. coli* C600, откуда ее с помощью трансдукции фагом P1 переносят в полученный на первом этапе штамм. Таким образом получают штамм *E. coli* VL2054, который является бесплазмидным продуцентом треонина. Кроме треонина в процессе ферментации штамм *E. coli* VL2054 способен накапливать также небольшие количества аланина, валина и изолейцина.

#### Гистидин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента гистидина, принадлежащего к роду *Escherichia*, представлен штаммом *E. coli* VL2160. Этот штамм получают на основе известного штамма NK5526 hisG::Tn10 (ВКПМ В-3384) путем переноса в него с помощью трансдукции фагом P1 мутации hisG<sup>R</sup>, нарушающей ингибирование гистидином АТФ-фосфорибозилтрансферазы, из штамма СС46 (Аствацатурянц и др., Генетика, т.24, с.1928-1934, 1988).

#### Пролин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента пролина принадлежащего к роду *Escherichia*; представлен штамм *E. coli* VL2151 (W3350 proB\* ΔputAP, Tn10), сконструированный на основе известного штамма W3350 (Campbell A. Virology 14, 22-32, 1961) путем введения в него с помощью трансдукции фагом P1 сцепленной с транспозоном Tn10 (zcc-282::Tn10 из штамма ВКПМ В-6194)) мутации ΔputAP, и последующей селекции мутанта, устойчивого к 3,4-дегидро-DL-пролину, способного накапливать пролин.

#### Аргинин –продуцирующие бактерии

В качестве продуцента аргинина, принадлежащего к роду *Escherichia coli*, используют штамм *E. coli* W3350 argE::Tn10/pKA10. Этот штамм является производным известного штамма W3350 (Campbell A. Virology 14, 22-32, 1961). Он имеет исерционную мутацию argE::Tn10 и содержит плазмиду pKA10, несущую фрагмент ДНК из *Corynebacterium* (*Brevibacterium*) *flavum* комплементирующий, по крайней мере, мутации argA и argE в

реципиентном штамме *E. coli* (Харитонов А.А., Тарасова А.П. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология, No.9, 29-33, 1986).

Гены белков секретирующих аминокислоты, по настоящему изобретению были идентифицированы впервые как это описано ниже.

Ранее авторы настоящего изобретения идентифицировали гены rhtB и rhtC как гены белков экскреции гомосерина и треонина у *Escherichia coli*. Далее, основываясь на предположении о том, что белки экскреции аминокислот должны иметь какое-то сходство в своей структуре, был осуществлен поиск белков, гомологичных RhtB.

Поиск гомологов осуществляли с помощью программы BLAST и PSI-BLAST (Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) в базах данных GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, Spupdate и PIR; с помощью программы BLITZ (Sturrock, S. S., and J. F. Collins. MPsch version 1.3. Biocomputing research unit. University of Edinburgh, UK(1993)) осуществлялся поиск в базе данных SWALL и с помощью программы SMART (Ogiwara, I. et al., Protein Sci. 5, 1991-1999 (1996) в базе транслированных генов SWISS-PROT. Из более 60 обнаруженных гомологичных последовательностей гены из *E. coli* yeaS (кодирует f212 в последовательности No. AE 000274 в базе данных GenBank), yahN (кодирует f223 в последовательности No. AE 000140 в базе данных GenBank), yfiK (кодирует o195 в последовательности No. AE 000344 в базе данных GenBank) и yggA (кодирует f211 в последовательности No. AE 000375 в базе данных GenBank) могут иметь функцию, сходную с функцией RhtB. Эти гены были выделены и клонированы на плазмидных векторах в клетках *E. coli*. Затем определялось влияние повышенного экспрессируемого количества продуктов этих генов на чувствительность клеток бактерий *E. coli* к высоким концентрациям аминокислот и аналогов аминокислот, а также на продукцию аминокислот. В результате была установлена повышенная устойчивость бактерий, содержащих плазмиды с генами yeaS, yahN, yfiK и

uggA, к определенным аминокислотам и их аналогам. Кроме того, была обнаружена повышенная продуктивность штаммов-продуцентов аминокислот, содержащих указанные плазмиды. Установлено также, что в этом отношении гены yahN, yeaS, yfiK, и uggA могут обладать как определенной избирательностью, так и проявлять множественный эффект.

Получение аминокислот по настоящему изобретению.

Получение аминокислот с помощью штаммов-продуцентов бактерий, полученных в соответствии с настоящим изобретением, осуществляют культивированием штаммов в питательной среде, обеспечивающей продукцию и накопление соответствующей аминокислоты в этой среде, с последующим выделением накопившейся аминокислоты из этой среды.

К числу аминокислот, которые получают по настоящему изобретению относятся лизин, треонин, глутаминовая кислота, гистидин, аланин, пролин, аргинин, валин и изолейцин.

В соответствии с настоящим изобретением, культивирование бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia*, выделение и очистку аминокислоты из культуральной жидкости осуществляют известными методами. Для культивирования используют синтетическую или натуральную среду. Такая среда включает источник углерода, азота, минеральные соли и необходимые добавки в количествах, оптимальных для роста и биосинтеза. В качестве источника углерода используют различные углеводы, такие как глюкоза, сахароза, различные органические кислоты. В зависимости от ассимилирующих способностей можно применять спирты, включая этанол или глицерол. В качестве источника азота используют аммиак, различные соли аммония, такие как сульфат аммония, или другие азотсодержащие соединения, такие как амины, а также природные источники азота, такие как пептон, гидролизат соевых бобов, или гидролизат микробных клеток. В качестве минеральных компонентов

используются фосфат калия однозамещенный, сульфат магния, хлористый натрий, сульфат железа, сульфат марганца, карбонат кальция. Культивирование преимущественно осуществляют в аэробных условиях, таких как культивирование на мешалке, или с аэрацией и перемешиванием культуры. Температура культивирования - от 30 до 40 °С, преимущественно 30-38 °С. pH среды - 5-9, преимущественно 6,5-7,2. pH среды доводят до желаемых значений с помощью аммония, карбоната кальция, различных кислот, оснований или буферов. Культивирование осуществляют в течение 1-3 дней. После завершения культивирования выделение аминокислоты осуществляют путем удаления твердых частиц, таких как клетки, из среды с помощью центрифугирования или фильтрации через мембранные фильтры с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты с помощью ионообменника, фракционирования с помощью концентрации и кристаллизации.

Перечень фигур.

Фиг.1. Последовательность белка YahN.

Фиг.2 Последовательность белка YeaS.

Фиг.3. Последовательность белка YfiK.

Фиг.4. Последовательность белка YggA.

Настоящее изобретение более конкретно поясняют нижеследующие примеры.

**Пример 1.** Получение фрагментов ДНК yahN, yeaS, yfiK, и ykkA, кодирующих синтез белков секретирующих аминокислоты.

Полная нуклеотидная последовательность хромосомы *Escherichia coli* K-12 известна (Science, 277, 1453-1474, 1997). На ее основе синтезируют праймеры, которые используют для амплификации фрагментов ДНК (генов) yahN, yeaS, yfiK, и ykkA, кодирующих синтез белков секретирующих аминокислоты с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

(1). В качестве матрицы используют хромосомную ДНК штамма *Echerichia coli* MG1655, которую выделяют по стандартной методике (Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Амплификацию проводили в термоциклере Techne PNC2, используя Taq полимеразу (Fermentas); условия реакции подбирают в зависимости от температуры плавления праймеров и размеров амплифицируемого фрагмента, как это описано в руководствах (PCR protocols. Current methods and applications. White, B.A., ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993)

Полученные продукты PCR очищают стандартным способом и рестрицируют как описано ниже.

Для амплификации гена yahN используют праймеры No.1 и No.2.

Праймер No.1: gtgtggaaccgacgccggat (последовательность, комплементарная последовательности нуклеотидов с 1885 по 1704 в последовательности AE000140, хранящейся в базе данных GenBank).

Праймер No.2: tgtgtatggtacggggttcgag (последовательность с 223 по 245 нуклеотид там же).

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментами PstI, StuI и, используя набор для лигирования, объединяют с вектором pUC21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991), обработанным ферментами PstI и EcoRV. Продуктом лигирования трансформируют компетентные клетки штамма *E.coli* TG1 (Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Клетки высевают на L-агар (бактотриптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л NaCl, агар - 15 г/л, pH 7.0) содержащий 10 мкг/мл IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) и 40 мкг/мл X-gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозид) and 100 мкг/мл ампицилина и выращивают в

течение ночи. Появляющиеся белые колонии отбирают и рассеивают до отдельных колоний на L-агаре с ампициллином. Из нескольких независимых очищенных таким образом трансформантов выделяют щелочным методом плазмидную ДНК и анализируют ее с помощью подходящих рестрицирующих ферментов. В результате получают плазмиду pYAHN.

Для амплификации гена yeaS используют праймеры No.3 и No.4.

Праймер No.3: ctttgccaatcccgtctccc (последовательность, комплиментарная нуклеотидам с 7683 по 7702 в последовательности AE000274 в GenBank)

Праймер No.4: gccccatgcataacggaaag (последовательность с 5542 по 5561 нуклеотид там же))

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментом *AvaI* и лигируют с вектором pUC19 и проводят описанные выше манипуляции. В результате получают плазмиду pYEAS.

Для амплификации гена yfiK используют праймеры No.5 и No.6.

Праймер No.5: gaagatcttgtaggccggataaggcg- (последовательность с 4155 по 4177 нуклеотид в последовательности AE000344 в GenBank, с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для *BglII*),

Праймер No.6: tggttttaccaattggccgc (последовательность, комплиментарная нуклеотидам с 6307 по 6326 в той же последовательности).

Полученный продукт ПЦР рестрицируют ферментами *BglII*, *MunI* и лигируют с вектором pUC21 рестрицированным ферментами *BglII* и *EcoRI* и проводят описанные выше манипуляции. В результате получают плазмиду pYFIK.

Для амплификации гена uggA были используют праймеры No.7 и No.8.

Праймер No.7: acttctcccgcgagccagttc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 9606 по 9626 в последовательности AE000375 в GenBank).

Праймер No.8: ggcaagcttagcgcctctgtt (последовательность с 8478 по 8498 нуклеотид, там же).

Продукт ПЦР рестрицируют ферментами HindIII и ClaI и лигируют с вектором pOK12 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189-194, 1991) и проводят описанные выше манипуляции. В результате получают плазмиду pYGGA.

Полученными плазмидами трансформируют известный штамм E. coli TG1 и штаммы E. coli – продуценты аминокислот.

(2). ).В качестве матрицы используют хромосомную ДНК штамма Echerichia coli W3110, которую выделяют по стандартной методике как описано выше.

Для амплификации гена yahN используют праймеры No.9 и No.10:

Праймер No.9: ggcgagctccagtaaccggaaataag (последовательность, комплементарная последовательности нуклеотидов с 1230 по 1247 в AE000140, GenBank с добавленным на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для рестрицирующего фермента SacI,).

Праймер No.10: cgctctagaaaggaccacgcattacgg (последовательность с 429 по 446 нуклеотид с добавленными на 5' в конце нуклеотидами, образующими сайт для для рестриктазы XbaI).

Для амплификации гена yeaS используют праймеры No.11 и No.12.

Праймер No.11: ggcgagctcagattggtagcatattc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 6542 по 6560 в AE000274 в GenBank с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайтом для распознавания рестриктазой SacI).

Праймер No.12: cggctctagaatcagcgaagaatcaggg- (последовательность с 5799 по 5816 нуклеотид с сайтом распознавания для рестриктазы XbaI, добавленным на 5'-конце).

Для амплификации гена yfiK используют праймеры No.13 и No.14.

Праймер No.13: ggcgagctcatgttccgtgtcgggtac (последовательность с 5192 по 5209 нуклеотид в последовательности AE000344 в GenBank с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания ферментом SacI).

Праймер No.14: ggctctagatagcaagttactaagcgg (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 5871 по 5854 нуклеотид с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания ферментом XbaI).

Для амплификации гена yggA были используют праймеры No.15 No.16.

Праймер No.15: ctctgaattctcttattagttttctgattgcc (последовательность, комплиментарная последовательности нуклеотидов с 9236 по 9270 в последовательности AE000375 в GenBank, с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания ферментом EcoRI).

Праймер No.16: cgtgacctgcagcgttctcacagcgcggtagcctttaa (последовательность с 8075 по 8112 нуклеотид с добавленными на 5' конце нуклеотидами, образующими сайт для распознавания PstI).

Полученные продукты ПЦР очищают как описано выше, рестрицируют ферментами SacI и XbaI (EcoRI и PstI для yggA) и лигируют с вектором pMW118, рестрицированным аналогичными ферментами. Нуклеотидную последовательность полученных вставок определяют с помощью ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) и автоматическим секвенатором ДНК (PE Applied Biosystems). Плазмиды, в которых нуклеотидная последовательность вставок соответствовала приведенной в GenBank, были отобраны и названы, соответственно:



несущая ген yahN: pMW118::yahN

несущая ген yeaS: pMW118::yeaS

несущая ген yfiK: pMW118::yfiK

несущая ген yggA: pMW118::yggA

Полученными плазмидами, трансформируют известный штамм JM109 и штамм-продуцент лизина.

**Пример 2** Влияние фрагментов ДНК yahN, yeaS, yfiK, и yggA на устойчивость бактерий *E.coli* к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот.

Гомология продуктов генов yeaS, yfhN, yahN и yggA с белком RhtB и с лизиновым транспортером LysE, осуществляющим экспорт L-лизина из клеток *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic et al., Mol. Microbiol., 22, 815-826, 1996), указывает на аналогичную функцию белков – продуктов указанных генов. Известно, что повышение активности генов, контролирующих транспорт из клеток различных ингибиторов роста, увеличивает их устойчивость к соответствующим соединениям. В связи с этим определяют влияние плазмид, несущих фрагменты ДНК yeaS, yahN, yahN и yggA, на устойчивость бактерий *E. coli* TG1 к некоторым аминокислотам и аналогам аминокислот. С этой целью штамм TG1 трансформируют плазмидами pYEAS, pYAHN, pYFIK, pYGGA и векторами pUC21, pUC19 и pOK12. Ночные культуры полученных штаммов, выращенные в минимальной среде M9 на качалке (около  $10^9$  клеток/мл) разводят 1:100 и подращивают в течение 5 часов в той же среде. Затем полученные культуры в логарифмической фазе роста разводят и приблизительно по  $10^4$  жизнеспособных клеток наносят на высушенные чашки с агаризованной (2% агара) средой M9, содержащей различные концентрации аминокислот, или аналогов аминокислот. Рост или отсутствие роста определяют через 46-48 часов. Таким образом устанавливают минимальные ингибирующие концентрации (МИК) этих соединений (Табл. 1).

Таблица 1

Соединение	МИК (мкг/мл) для штамма E. coli TG1, несущего плазмиды				
	pUC21*	PYFIK	pYAHN	pYEAS	PYGGA
L-Гомосерин	500	<b>1000</b>	500	<b>1000</b>	500
L-Треонин	30000	<b>40000</b>	30000	<b>50000</b>	30000
L-Лизин HCl	5000	<b>7500</b>	5000	<b>7500</b>	<b>10000</b>
L-Глутаминовая кислота (натриевая соль)	5000	<b>10000</b>	5000	<b>20000</b>	5000
L-Гистидин	5000	<b>10000</b>	5000	<b>30000</b>	5000
L-Валин	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L-Пролин	1000	<b>5000</b>	<b>2000</b>	<b>2000</b>	1000
L-Аргинин	10000	10000	10000	10000	<b>20000</b>
АЭЦ	5	<b>10</b>	5	5	<b>200</b>
АОВ	100	<b>200</b>	100	100	100
$\alpha$ -Аминомасляная кислота	2500	<b>5000</b>	2500	<b>10000</b>	2500
3,4-Дегидро-DL-пролин	10	10	10	10	10

\*Аналогичные результаты получены и для штамма TG1, несущего плазмиды pUC19 и pOK12.

Как видно из Таблицы 1, амплификация фрагмента ДНК yfiK существенно повышает устойчивость бактерий к пролину, в меньшей степени возрастает устойчивость к треонину, гомосерину, глутамату,  $\alpha$ -аминомасляной кислоте, к аналогу треонина,  $\alpha$ -амино- $\beta$ -оксивалериановой кислоте (АОВ) и к аналогу L-лизина, (S)-2-аминоэтил-L-цистеину (АЭЦ). Амплификация фрагмента ДНК yahN повышает устойчивость бактерий к пролину. Амплификация фрагмента ДНК yeaS существенно повышает устойчивость бактерий к глутамату, гистидину и  $\alpha$ -аминомасляной кислоте, в меньшей степени возрастает устойчивость к треонину, гомосерину, лизину.

Амплификация фрагмента ДНК uggA существенно повышает устойчивость бактерий к (S)-2-аминоэтил-L-цистеину (АЭЦ) и лизину, в меньшей степени возрастает устойчивость к аргинину.

Эти результаты свидетельствуют о том, что почти каждый из белков секретирующих аминокислоты, кодируемых указанными фрагментами ДНК, обладают специфичностью по отношению к нескольким субстратам (аминокислотам) или может обнаруживать неспецифический эффект в результате амплификации.

**Пример 3.** Влияние амплификации фрагментов ДНК yeaS, yahN, yfiK на продукцию глутаминовой кислоты.

В качестве продуцента глутаминовой кислоты используют штамм *E. coli* AJ13199 (Патент Франции No.2747689).

Штамм AJ13199 трансформируют отдельно каждой из плазмид pYAHN, pYEAS, pYFIK, несущей фрагменты ДНК кодирующие белки секретирующих аминокислоты, а в качестве контроля - вектором pUC21. В результате получают штаммы:

AJ13199/pYAHN (ВКПМ В-7729); AJ13199/pYEAS (ВКПМ В-7731); AJ13199/pYFIK (ВКПМ В-7730) и AJ13199/pUC21 (ВКПМ В-7728).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37 °С 18 часов в LB бульоне содержащем 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37°С 46 часов на роторной качалке (120 об/мин).

После культивирования количество глутаминовой кислоты в культуральной жидкости определяют известным методом. Результаты представлены в Табл.2.

Состав ферментационной среды (г/л):

Глюкоза	80,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	22,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
NaCl	0,8
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,8
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,02
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,02
Тиамин HCl	0,0002
Дрожжевой экстракт	1,0
CaCO <sub>3</sub>	30,0

Глюкоза и сернокислый магний стерилизуются отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизуется сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводится до 7.0. Антибиотики вносят в среду после стерилизации.

Таблице 2.

Штамм	Глутаминовая кислота, г/л
AJ13199/pUC21	21.9
AJ13199/pYAHN	27.9
AJ13199/pYEAS	29.7
AJ13199//pYFIK	28.4

Как следует из таблицы 2, увеличение экспрессируемого количества каждого из белков YahN, YeaS и YfiK, кодируемых соответствующими генами, локализованными на многокопийных плаزمиде, повышает продукцию глутаминовой кислоты штаммом-продуцентом. Наибольший эффект дает ген yeaS, амплификация которого повышает продукцию аминокислоты на 35%.

**Пример 4.** Влияние амплификации фрагментов ДНК yeaS, yahN, yfiK и yggA, на продукцию лизина.

(1). В качестве исходного лизин-продуцирующего штамма используют штамм *E.coli* W3110 (*tyrA*) (Европейский патент No.488424), в который вводят плазмиду pCABD2 (Международной заявке WO 95/16042) и каждую из плазмид pMW118::*yahN*, pMW118::*yeaS*, pMW118::*yfiK*, несущих гены экскреции аминокислот, а также вектор pMW118. Так были получены следующие штаммы *E. coli*:

W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yahN*, W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yeaS*,  
W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118::*yfiK*, W3110 (*tyrA*)/pCABD2+pMW118.

Способность к продукции лизина этими штаммами определяют культивируя их в ферментационной среде следующего состава (г/л):

Глюкоза	40,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
Дрожжевой экстракт	2,0
Тирозин	0,1
CaCO <sub>3</sub>	25,0

Глюкоза и сернокислый магний стерилизуется отдельно. CaCO<sub>3</sub> стерилизуется сухим жаром при 180°C в течение 2 часов. pH доводится до 7.0. Антибиотики, ампицилин - 50 мг/л и хлорамфеникол - 25 мг/л, вносят в среду после стерилизации.

Культивирование осуществляют при 37°C в течение 30 часов с аэрацией (ротаторная качалка, 115 об./мин). Результаты представлены в Табл.3

Таблица 3

Штамм <i>E. coli</i>	Лизин, г/л	Выход на 1 г. сахара, (%)
W3110 (tyrA)	0,08	0,2
W3110 (tyrA)/pCABD2, pMW118	12,2	30,5
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yahN	13,8	34,5
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yeaS	12,7	31,8
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yfiK	12,2	30,5

Как следует из Табл. 3, из исследованных в этом примере генов наибольший эффект на продукцию лизина оказывает ген yahN.

(2). В качестве исходного лизин-продуцирующего штамма используют штамм *E. coli* VL614. Этот штамм является производным известного штамма *E. coli* VL613 (Авторское свидетельство СССР No.1354458). Штамм VL614 получают трансдукцией с помощью фага P1 в исходный штамм VL613 дикого аллеля rhtA<sup>+</sup>, сцепленного с транспозоном Tn10. Трансдуктанты отбирают на среде LB с тетрациклином (10 мг/л) и среди них находят клоны, чувствительные на минимальной среде к гомосерину (10 г/л). Полученный таким путем штамм VL614 трансформируют плазмидой pYGGA и в качестве контроля - вектором pOK12. В результате получают штаммы VL614/pYGGA (ВКПМ В-7719) и VL614/pOK12 (ВКПМ В-7722).

Каждый из полученных штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне с 50 мг/л канамицина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесут в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3,

содержащей 50 мг/л канамицина, и культивируют при 34° С 68 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде лизина, а также глутаминовой кислоты измеряют известными методами. Результаты представлены в Табл.4.

Таблица 4

Штамм E. coli	Лизин, г/л	Глутамат, (г/л)
VL614/pOK12	2.6	0,8
VL614/pYGGA	3.6	2.2

Как видно из Табл.4, амплификация фрагмента ДНК uggA на плазмиде pOK12 заметно повышает продукцию лизина. Одновременно с этим повышается накопление в культуральной жидкости и глутаминовой кислоты.

**Пример 5.** Влияние амплификации фрагментов ДНК yfiK и yeaS на продукцию треонина, аланина, валина и изолейцина.

В качестве продуцента треонина используют штамм E. coli VL2054. Этот штамм является бесплазмидным продуцентом треонина полученным на основе известного штамма E. coli ВКПМ В-3996 (Патент США No. 5 175 107), и получен на его основе после элиминации плазмиды pVIC40, введения с помощью трансдукции фагом P1 сцепленного с транспозоном Tn10 дикого аллеля гена rhtA и индукции мутации, повреждающей ген kan транспозона Tn5, интегрированный в ген tdh. Он содержит интегрированный в хромосому вектор миниMu (Mud), в который под P<sub>R</sub>-промоторм фага ламбда клонированы гены треонинового оперона из плазмиды pVIC40 и ген cat устойчивости к хлорамфениколу. Кроме треонина в процессе ферментации штамм E.

coli VL2054 способен накапливать также небольшие количества аланина, валина и изолейцина.

Штамм *E. coli* VL2054 трансформируют отдельно каждой из плазмид pYEAS, pYFIK, а также вектором pUC21. В результате получают штаммы *E. coli* VL2054/pYEAS (ВКПМ В-7707), *E. coli* VL2054/pFIK (ВКПМ В-7712) и *E. coli* VL2054/pUC21 (ВКПМ В-7708).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37 °C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленных в культуральной жидкости треонина, аланина, валина и изолейцина измеряют известными методами. Результаты представлены в Табл.5.

Таблица 5

Штамм <i>E. coli</i>	Накопление аминокислоты, г/л			
	Треонина	Аланина	Валина	Изолейцина
VL2054/pUC21	5.8	0.4	0,31	0,15
VL2054/pYEAS	5,2	1.4	0,52	0,45
VL2054/pYFIK	8.8	0.5	0.22	0.14

Как показано в Табл.5, штамм *E. coli* VL2054/pYFIK накапливает в культуральной жидкости значительно больше треонина, чем штамм *E. coli* VL2054/pUC21, в котором экспрессируемое количество продукта гена *yfiK* не увеличено. Штамм *E. coli* VL2054/pYEAS накапливает больше аланина, валина и изолейцина чем контрольный штамм *E. coli* VL2054/pUC21.



**Пример 6.** Влияние амплификации фрагментов ДНК yeaS и yfiK на продукцию гистидина.

В качестве продуцента гистидина, принадлежащего к роду *Escherichia*, используют штамм *E. coli* VL2160. Этот штамм получают на основе известного штамма NK5526 hisG::Tn10 (ВКПМ В-3384) путем переноса в него с помощью трансдукции фагом P1 мутации hisG<sup>R</sup>, нарушающей ингибирование гистидином АТФ-фосфорибозилтрансферазы, из штамма СС46 (Аствацатурянц и др., Генетика, т.24, с.1928-1934, 1988). Штамм VL2160 трансформируют отдельно каждой из плазмид pYEAS, pYFIK, а также вектором pUC21. В результате получают штаммы: *E. coli* VL2160/pYEAS (ВКПМ В-7753), *E. coli* VL2160/pYFIK (ВКПМ В-7754), *E. coli* VL2160/pUC21 (ВКПМ В-7752).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды для получения гистидина, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37°C 70 часов на роторной качалке.

Состав ферментационной среды для получения гистидина (г/л):

Глюкоза	90,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	28,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,0
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,01
Тиамин HCl	0,001
CaCO <sub>3</sub>	30,0

После культивирования количество накопленного в среде гистидина определяют известным методом. Результаты представлены в Табл.6.

Таблица 6

Штамм <i>E. coli</i>	Гистидин, г/л
VL2160/pUC21	1.2
VL2160/pYEAS	1.8
VL2160/pYFIK	1.4

Как следует из Табл.6, штаммы *E. coli* VL2160/pYEAS и *E. coli* VL2160/pYFIK продуцируют больше гистидина, чем штаммы *E. coli* VL2160/pUC21, у которого экспрессируемое количество белков, продуктов генов yeaS и yfiK, не увеличено. При этом видно, что наибольший положительный эффект на продукцию гистидина дает амплификация на плазмиде гена yeaS.

**Пример 7.** Влияние амплификации фрагментов ДНК yahN, yfiK и yeaS на продукцию пролина

В качестве продуцента пролина, принадлежащего к роду *Escherichia*, используют штамм VL2151 (*E. coli* W3350 proB\* ΔputAP Tn10), сконструированный на основе известного штамма W3350 путем введения с помощью трансдукции фагом P1 мутации ΔputAP, сцепленной с транспозоном Tn10, и последующей селекции мутантов, устойчивых к 20 мкг/мл 3,4-дегидро-DL-пролина

Штамм *E. coli* VL2151 трансформируют отдельно каждой из плазмид pYAHN, pYEAS, pYFIK, а также вектором pUC21. В результате получают штаммы *E. coli* VL2151/pYEAS (ВКПМ В-7714), VL2151/pYAHN (ВКПМ В-7748), *E. coli* VL2151/pFIK (ВКПМ В-7713) и *E. coli* VL2151/pUC21 (ВКПМ В-7715).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37 °С 18 часов в LB бульоне со 100 мг/л ампициллина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости внесят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и культивируют при 37С 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде пролина определяют известным методом. Результаты представлены в табл.7.

Таблица 7

Штамм E. coli	Пролин, г/л
VL2151/pUC21	1.8
VL2151/pYAHN	2.2
VL2151/pYEAS	2.1
VL2151/pYFIK	2.5

Как видно из Табл.7, штаммы E. coli VL2151/pYFIK, E. coli VL2151/pYAHN и E. coli VL2151/pYEAS накапливают больше пролина, чем штаммы E. coli VL2151/pUC21, у которого экспрессируемое количество белков, продуктов генов yfiK, yahN, и ycaS, не увеличено. При этом видно, что наибольший положительный эффект на продукцию пролина оказывает ген yfiK.

#### **Пример 8.** Влияние амплификации фрагмента ДНК uggA на продукцию аргинина

В качестве продуцента аргинина, принадлежащего к роду *Escherichia coli*, используют штамм E. coli W3350 argE::Tn10/pKA10, который содержит плазмиду pKA10, несущую гены биосинтеза аргинина из *Corynebacterium glutamicum* (Харитонов А.А., Тарасов А.П. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология, No.9, 29-33, 1986).

Штамм E. coli W3350 argE::Tn10/pKA10 трансформируют плазмидой pYGGA, а в качестве контроля - вектором pOK12. В результате получают штаммы E. coli W3350

argE::Tn10/pKA10, pYGGA (ВКПМ В-7716) и E. coli W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12 ВКПМ В-7718).

Каждый из полученных таким образом штаммов культивируют при 37°C 18 часов в LB бульоне с 100 мг/л ампициллина и 50 мг/л канамицина. Затем по 0.3 мл полученной культуральной жидкости вносят в пробирки 20 x 200 мм с 3 мл ферментационной среды, описанной в примере 3, содержащей 100 мг/л ампициллина и 50 мг/л канамицина и культивируют при 37C 46 часов на роторной качалке. После культивирования количество накопленного в среде аргинина измеряют известным методом. Результаты представлены в табл.8.

Таблица 8

Штамм E. coli	Аргинин, г/л
W3350 <u>argE</u> ::Tn10/pKA10, pOK12	0.11
W3350 <u>argE</u> ::Tn10/pKA10, pYGGA	0.46

Как видно из табл.8, штамм E. coli штаммы E. coli W3350 argE::Tn10/pKA10, pYGGA накапливают больше аргинина, чем штамм E. coli W3350 argE::Tn10/pKA10, pOK12, у которого экспрессируемое количество белка, продукта гена ykkA, не увеличено.

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*, yahN, определяющий повышенную продукцию аминокислот, имеющий следующую нуклеотидную последовательность

(последовательность No.1)

atg atg cag tta gtt cac tta ttt atg gat gaa atc act atg gat cct	48
Met Met Gln Leu Val His Leu Phe Met Asp Glu Ile Thr Met Asp Pro	
1 5 10 15	
ttg cat gcc gtt tac ctg acc gta gga ctg ttc gtg att act ttt ttt	96
Leu His Ala Val Tyr Leu Thr Val Gly Leu Phe Val Ile Thr Phe Phe	
20 25 30	
aat ccg gga gcc aat ctc ttt gtg gta gta caa acc agc ctg gct tcc	144
Asn Pro Gly Ala Asn Leu Phe Val Val Val Gln Thr Ser Leu Ala Ser	
35 40 45	
ggt cga cgc gca ggg gtg ctg acc ggg ctg ggc gtg gcg ctg ggc gat	192
Gly Arg Arg Ala Gly Val Leu Thr Gly Leu Gly Val Ala Leu Gly Asp	
50 55 60	
gca ttt tat tcc ggg ttg ggt ttg ttt ggt ctt gca acg cta att acg	240
Ala Phe Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Phe Gly Leu Ala Thr Leu Ile Thr	
65 70 75 80	
cag tgt gag gag att ttt tcc ctt atc aga atc gtc ggc ggc gct tat	288
Gln Cys Glu Glu Ile Phe Ser Leu Ile Arg Ile Val Gly Gly Ala Tyr	
85 90 95	
ctc tta tgg ttt gcg tgg tgc agc atg cgc cgc cag tca aca ccg caa	336
Leu Leu Trp Phe Ala Trp Cys Ser Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Gln	
100 105 110	
atg agc aca cta caa caa ccg att agc gcc ccc tgg tat gtc ttt ttt	384
Met Ser Thr Leu Gln Gln Pro Ile Ser Ala Pro Trp Tyr Val Phe Phe	
115 120 125	
cgc cgc gga tta att acc gat ctc tct aac ccg caa acc gtt tta ttt	432
Arg Arg Gly Leu Ile Thr Asp Leu Ser Asn Pro Gln Thr Val Leu Phe	
130 135 140	
ttt atc agt att ttc tca gta aca tta aat gcc gaa aca cca aca tgg	480
Phe Ile Ser Ile Phe Ser Val Thr Leu Asn Ala Glu Thr Pro Thr Trp	
145 150 155 160	
gca cgt tta atg gcc tgg gcg ggg att gtg ctc gca tca att atc tgg	528
Ala Arg Leu Met Ala Trp Ala Gly Ile Val Leu Ala Ser Ile Ile Trp	
165 170 175	
cga gtt ttt ctt agt cag gcg ttt tct ttg ccc gct gtg cgt cgt gct	576
Arg Val Phe Leu Ser Gln Ala Phe Ser Leu Pro Ala Val Arg Arg Ala	
180 185 190	
tat ggg cgt atg caa cgc gtt gcc agt cgg gtt att ggt gca att att	624
Tyr Gly Arg Met Gln Arg Val Ala Ser Arg Val Ile Gly Ala Ile Ile	
195 200 205	
ggt gta ttc gcg cta cgc ctg att tac gaa ggg gtg acg cag cgg tga	672
Gly Val Phe Ala Leu Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Thr Gln Arg	
210 215 220	

2. Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*, *yeaS*, определяющий повышенную продукцию аминокислот, имеющий следующую нуклеотидную последовательность

(последовательность No.2)

gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg	48
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly	
1 5 10 15	
gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc	96
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu	
20 25 30	
aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc	144
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys	
35 40 45	
ggt gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga	192
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly	
50 55 60	
gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt	240
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg	
65 70 75 80	
tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac	288
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr	
85 90 95	
gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa	336
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln	
100 105 110	
tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg	384
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro	
115 120 125	
aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt	432
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val	
130 135 140	
aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg	480
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu	
145 150 155 160	
gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct	528
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala	
165 170 175	
ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc	576
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly	
180 185 190	
aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg	624
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala	
195 200 205	
acg ctg caa tcc tga	639
Thr Leu Gln Ser	
210	



4. Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*, *uggA*, определяющий повышенную продукцию аминокислот, имеющий следующую нуклеотидную последовательность

gtg	ttt	tct	tat	tac	ttt	caa	ggt	ctt	gca	ctt	ggg	gcg	gct	atg	atc	48
Met	Phe	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Met	Ile	
1				5				10						15		
cta	ccg	ctc	ggt	cca	caa	aat	gct	ttt	gtg	atg	aat	cag	ggc	ata	cgt	96
Leu	Pro	Leu	Gly	Pro	Gln	Asn	Ala	Phe	Val	Met	Asn	Gln	Gly	Ile	Arg	
			20				25						30			
cgt	cag	tac	cac	att	atg	att	gcc	tta	ctt	tgt	gct	atc	agc	gat	ttg	144
Arg	Gln	Tyr	His	Ile	Met	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Ile	Ser	Asp	Leu	
		35					40					45				
gtc	ctg	att	tgc	gcc	ggg	att	ttt	ggt	ggc	agc	gcg	tta	ttg	atg	cag	192
Val	Leu	Ile	Cys	Ala	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Leu	Met	Gln	
	50					55				60						
tcg	ccg	tgg	ttg	ctg	gcg	ctg	gtc	acc	tgg	ggc	ggc	gta	gcc	ttc	ttg	240
Ser	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Trp	Gly	Gly	Val	Ala	Phe	Leu	
65					70				75					80		
ctg	tgg	tat	ggt	ttt	ggc	gct	ttt	aaa	aca	gca	atg	agc	agt	aat	att	288
Leu	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Met	Ser	Ser	Asn	Ile	
				85				90						95		
gag	tta	gcc	agc	gcc	gaa	gtc	atg	aag	caa	ggc	aga	tgg	aaa	att	atc	336
Glu	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Lys	Gln	Gly	Arg	Trp	Lys	Ile	Ile	
		100					105					110				
gcc	acc	atg	ttg	gca	gtg	acc	tgg	ctg	aat	ccg	cat	gtt	tac	ctg	gat	384
Ala	Thr	Met	Leu	Ala	Val	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Asp	
		115					120					125				
act	ttt	gtt	gta	ctg	ggc	agc	ctt	ggc	ggg	caa	ctt	gat	gtg	gaa	cca	432
Thr	Phe	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Gln	Leu	Asp	Val	Glu	Pro	
	130					135					140					
aaa	cgc	tgg	ttt	gca	ctc	ggg	aca	att	agc	gcc	tct	ttc	ctg	tgg	ttc	480
Lys	Arg	Trp	Phe	Ala	Leu	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Trp	Phe	
145				150					155				160			
ttt	ggt	ctg	gct	ctt	ctc	gca	gcc	tgg	ctg	gca	ccg	cgt	ctg	cgc	acg	528
Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Pro	Arg	Leu	Arg	Thr	
				165				170					175			
gca	aaa	gca	cag	cgc	att	atc	aat	ctg	gtt	gtg	gga	tgt	gtt	atg	tgg	576
Ala	Lys	Ala	Gln	Arg	Ile	Ile	Asn	Leu	Val	Val	Gly	Cys	Val	Met	Trp	
		180						185					190			
ttt	att	gcc	ttg	cag	ctg	gcg	aga	gac	ggg	att	gct	cat	gca	caa	gcc	624
Phe	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Ala	His	Ala	Gln	Ala	
		195					200					205				
ttg	ttc	agt	tag													636
Leu	Phe	Ser														
	210															



5. Способ получения L-аминокислот путем культивирования штаммов-продуцентов бактерий рода *Escherichia* в подходящей питательной среде с последующим выделением и очисткой целевой аминокислоты, отличающийся тем, что в качестве продуцентов используют бактерии *E. coli*, у которых продукция аминокислот повышена в результате повышения экспрессируемого количества по крайней мере одного из белков, кодируемых фрагментом ДНК по п.1, или по п.2, или по п.3, или п.4.

**Фрагмент ДНК из Escherichia coli,  
определяющий повышенную продукцию  
аминокислот (варианты), и способ  
получения L-аминокислот**

Met	Met	Gln	Leu	Val	His	Leu	Phe	Met	Asp	Glu	Ile	Thr	Met	Asp	Pro
1				5				10					15		
Leu	His	Ala	Val	Tyr	Leu	Thr	Val	Gly	Leu	Phe	Val	Ile	Thr	Phe	Phe
			20					25					30		
Asn	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Val	Gln	Thr	Ser	Leu	Ala	Ser
		35					40					45			
Gly	Arg	Arg	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Asp
	50					55					60				
Ala	Phe	Tyr	Ser	Gly	Leu	Gly	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Thr	Leu	Ile	Thr
65					70					75					80
Gln	Cys	Glu	Glu	Ile	Phe	Ser	Leu	Ile	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Ala	Tyr
				85					90					95	
Leu	Leu	Trp	Phe	Ala	Trp	Cys	Ser	Met	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Pro	Gln
			100					105					110		
Met	Ser	Thr	Leu	Gln	Gln	Pro	Ile	Ser	Ala	Pro	Trp	Tyr	Val	Phe	Phe
		115					120						125		
Arg	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Gln	Thr	Val	Leu	Phe
	130					135					140				
Phe	Ile	Ser	Ile	Phe	Ser	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Glu	Thr	Pro	Thr	Trp
145					150					155					160
Ala	Arg	Leu	Met	Ala	Trp	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Ile	Trp
			165					170					175		
Arg	Val	Phe	Leu	Ser	Gln	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Arg	Ala
		180						185					190		
Tyr	Gly	Arg	Met	Gln	Arg	Val	Ala	Ser	Arg	Val	Ile	Gly	Ala	Ile	Ile
		195					200					205			
Gly	Val	Phe	Ala	Leu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Glu	Gly	Val	Thr	Gln	Arg	
	210					215						220			

**Фиг. 1. Последовательность № 5**

**Фрагмент ДНК из Escherichia coli,  
определяющий повышенную продукцию  
аминокислот (варианты), и способ  
получения L-аминокислот**

Met	Phe	Ala	Glu	Tyr	Gly	Val	Leu	Asn	Tyr	Trp	Thr	Tyr	Leu	Val	Gly
1				5					10				15		
Ala	Ile	Phe	Ile	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Pro	Asn	Thr	Leu	Phe	Val	Leu
			20					25					30		
Lys	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	Met	Lys	Gly	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	Cys
		35					40					45			
Gly	Val	Phe	Ile	Gly	Asp	Ala	Val	Leu	Met	Phe	Leu	Ala	Trp	Ala	Gly
	50				55						60				
Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Lys	Thr	Thr	Pro	Ile	Leu	Phe	Asn	Ile	Val	Arg
	65				70					75				80	
Tyr	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Leu	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Tyr
				85					90					95	
Ala	Thr	Leu	Lys	Gly	Lys	Asn	Ser	Glu	Ala	Lys	Ser	Asp	Glu	Pro	Gln
			100					105					110		
Tyr	Gly	Ala	Ile	Phe	Lys	Arg	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Leu	Thr	Asn	Pro
	115						120					125			
Lys	Ala	Ile	Leu	Phe	Tyr	Val	Ser	Phe	Phe	Val	Gln	Phe	Ile	Asp	Val
	130					135					140				
Asn	Ala	Pro	His	Thr	Gly	Ile	Ser	Phe	Phe	Ile	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu
	145				150					155				160	
Glu	Leu	Val	Ser	Phe	Cys	Tyr	Leu	Ser	Phe	Leu	Ile	Ile	Ser	Gly	Ala
			165						170				175		
Phe	Val	Thr	Gln	Tyr	Ile	Arg	Thr	Lys	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Val	Gly
		180						185					190		
Asn	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Met	Phe	Val	Gly	Phe	Ala	Ala	Arg	Leu	Ala
	195					200						205			
Thr	Leu	Gln	Ser												
	210														

**Фиг. 2. Последовательность № 6**

**Фрагмент ДНК из Escherichia coli,  
определяющий повышенную продукцию  
аминокислот (варианты), и способ  
получения L-аминокислот**

```

Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr
 1           5           10           15
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr
          20           25           30
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu
          35           40           45
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu
          50           55           60
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala
          65           70           75           80
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys
          85           90           95
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala
          100          105          110
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu
          115          120          125
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly
          130          135          140
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp
          145          150          155          160
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg
          165          170          175
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg
          180          185          190
Ile Phe Tyr
          195

```

**Фиг. 3. Последовательность № 7**

Фрагмент ДНК из *Escherichia coli*,  
определяющий повышенную продукцию  
аминокислот (варианты), и способ  
получения L-аминокислот

Met	Phe	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Met	Ile
1				5				10						15	
Leu	Pro	Leu	Gly	Pro	Gln	Asn	Ala	Phe	Val	Met	Asn	Gln	Gly	Ile	Arg
			20					25					30		
Arg	Gln	Tyr	His	Ile	Met	Ile	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Ile	Ser	Asp	Leu
		35					40					45			
Val	Leu	Ile	Cys	Ala	Gly	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Leu	Met	Gln
	50					55				60					
Ser	Pro	Trp	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Thr	Trp	Gly	Gly	Val	Ala	Phe	Leu
65					70				75					80	
Leu	Trp	Tyr	Gly	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Thr	Ala	Met	Ser	Ser	Asn	Ile
			85					90						95	
Glu	Leu	Ala	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Lys	Gln	Gly	Arg	Trp	Lys	Ile	Ile
		100						105					110		
Ala	Thr	Met	Leu	Ala	Val	Thr	Trp	Leu	Asn	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Asp
	115					120						125			
Thr	Phe	Val	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Gly	Gln	Leu	Asp	Val	Glu	Pro
	130				135					140					
Lys	Arg	Trp	Phe	Ala	Leu	Gly	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Trp	Phe
145				150					155					160	
Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Pro	Arg	Leu	Arg	Thr
			165					170					175		
Ala	Lys	Ala	Gln	Arg	Ile	Ile	Asn	Leu	Val	Val	Gly	Cys	Val	Met	Trp
		180					185					190			
Phe	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Ala	His	Ala	Gln	Ala
	195					200					205				
Leu	Phe	Ser													
210															

Фиг. 4. Последовательность № 8

## РЕФЕРАТ

### ФРАГМЕНТ ДНК, ИЗ *ESCHERICHIA COLI*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПОВЫШЕННУЮ ПРОДУКЦИЮ АМИНОКИСЛОТ (ВАРИАНТЫ), И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ

Изобретение относится к биотехнологии и генетической инженерии. Заявлены фрагменты ДНК *yahN*, *yeaS*, *yfiK*, *yggA* кодирующие синтез белков, придающих бактериям *Escherichia coli* повышенную устойчивость к аминокислотам или их аналогам. На основе этих фрагментов сконструированы штаммы бактерий *E. coli*, обладающие повышенной способностью к продукции L-лизина, L-треонина, L-глутаминовой кислоты, L-гистидина, L-пролина, L-аланина, L-аргинина, L-валина и L-изолейцина. Описан способ получения аминокислот с использованием новых штаммов-продуцентов.



# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7707

31 декабря 98

## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИГенетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру *Escherichia coli* VL2054 (pYEAS)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: треонин**

**Депозитор: ГосНИИГенетика**



**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7707**

Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the <b>DEPOSITOR</b>  Escherichia coli VL2054(pYEAS)	Accession number given by the <b>INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:</b> VKPM B- 7707
---	--

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of threonine  
  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

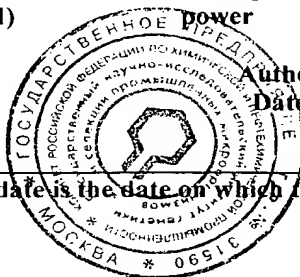
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International  
Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Official stamp and signature of Sineoky S.P.



Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7707  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

---

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

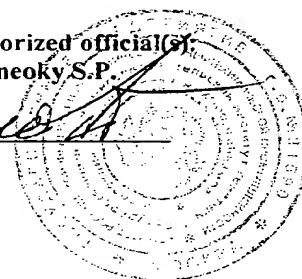
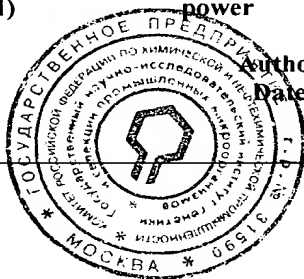
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

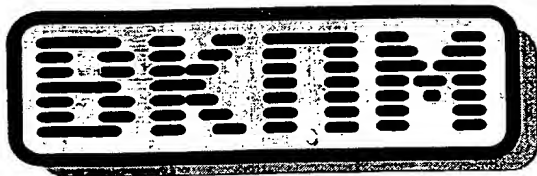
Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s)

Date:

Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7708

31 декабря 98

## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

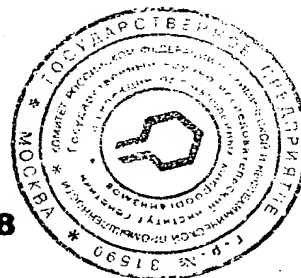
культуру *Escherichia coli* VL2054 (pUC21)

Продукт, синтезируемый штаммом: треонин, аланин

Депозитор: ГосНИИ Генетика

Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7708



Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the <b>DEPOSITOR</b>  Escherichia coli VL2054 (pUC21)	Accession number given by the <b>INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:</b> VKPM B-7708
--	---

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of threonine, alanine  
  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

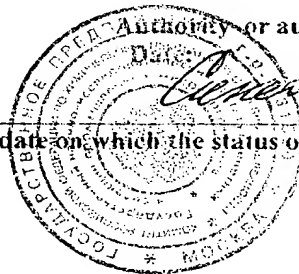
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Simeon S.P.



1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired

Appendix 3

page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7708  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

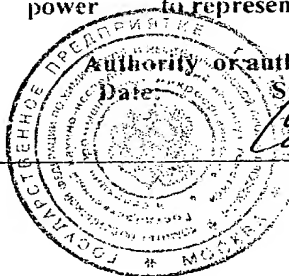
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

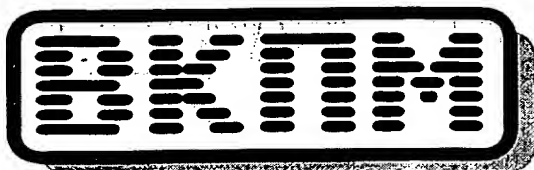
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sinokky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7712

31 декабря 98

## СПРАВКА

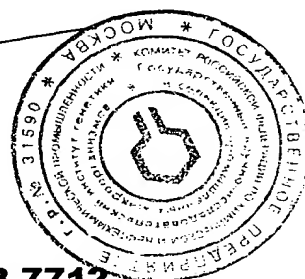
**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИГенетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli VL2054 (pYFIK)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: треонин**

**Депозитор: ГосНИИГенетика**

Зав. ВКПМ \_\_\_\_\_



**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7712**

Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the <b>DEPOSITOR</b>  Escherichia coli VL2054(pYFIK)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY: VKPM B- 7712
---	--

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of threonine  
  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

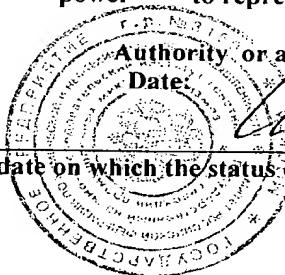
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Simeoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7712  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

---

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

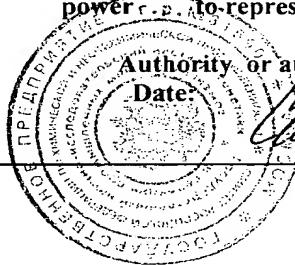
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

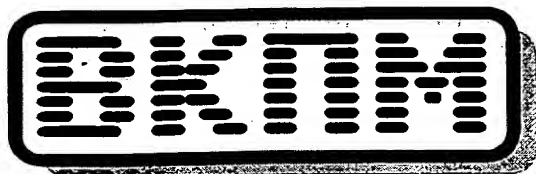
Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date:

Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7713

31 декабря 98

## СПРАВКА

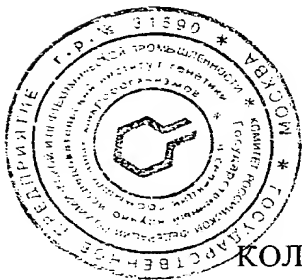
Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИГенетика

приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2151 (pYFIK)

Продукт, синтезируемый штаммом: пролин

Депозитор: ГосНИИГенетика



Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7713



Appendix 3  
page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of micro organisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:
Escherichia coli VL2151 (pYFIK)	VKPM B- 7713

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description      Producer of proline  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority on (date of original deposit) and a request to convert  
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

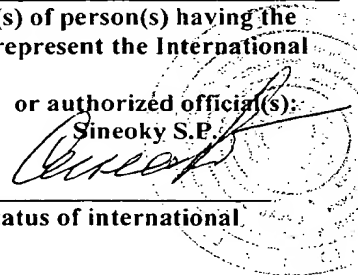
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



**Appendix 3**  
**page 24**  
**Budapest treaty on the international**  
**recognition of the deposit of microorganisms**  
**for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

**INTERNATIONAL FORM**  
**VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY**  
**AUTHORITY**  
VKPM B-7713  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

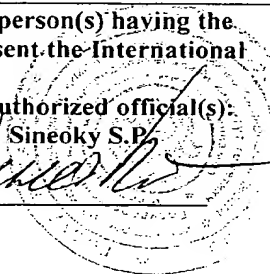
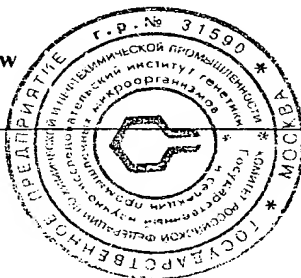
---

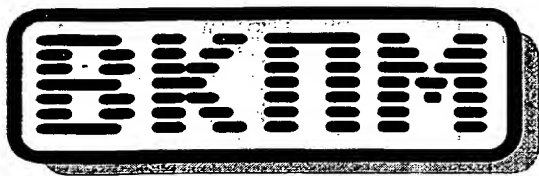
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7714

31 декабря 98

## СПРАВКА

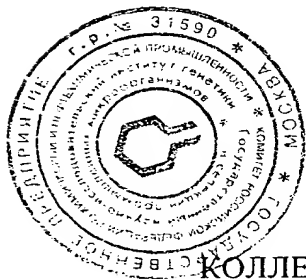
Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика

приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2151 (pYEAS)

Продукт, синтезируемый штаммом: пролин

Депозитор: ГосНИИ Генетика



Зав. ВКПМ \_\_\_\_\_

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7714

Appendix 3  
page 14  
**Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
.  
Moscow 113545  
!-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

**INTERNATIONAL FORM**  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

<b>Identification reference given by the DEPOSITOR</b>	<b>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:</b>
Escherichia coli VL2151 (pYEAS)	VKPM B- 7714

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

  x   a scientific description                               Producer of proline  
         a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I  
which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

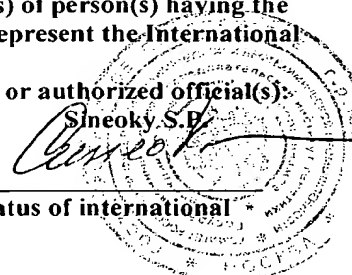
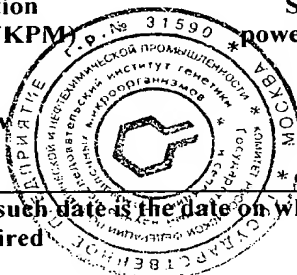
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International  
Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



**Appendix 3**

**page 24**

**Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

**INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY**  
VKPM B-7714  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

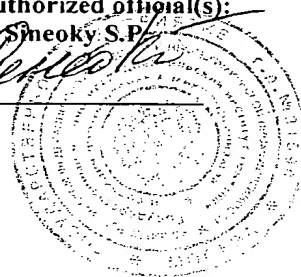
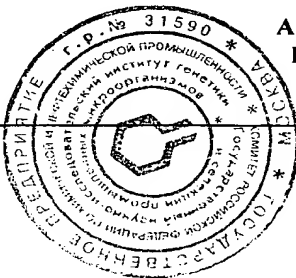
---

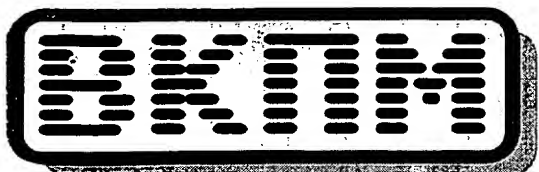
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7715

31 декабря 98

## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2151 (pUC21)

Продукт, синтезируемый штаммом: пролин

Депозитор: ГосНИИ Генетика



ав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7715

Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the <b>DEPOSITOR</b>  Escherichia coli VL2151 (pUC21)	Accession number given by the <b>INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:</b>  VKPM B- 7715
--	--

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of proline

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7715  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

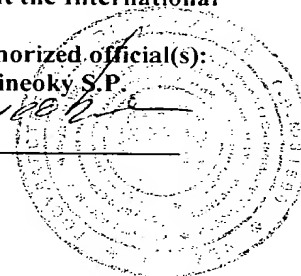
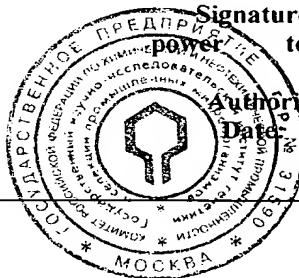
---

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

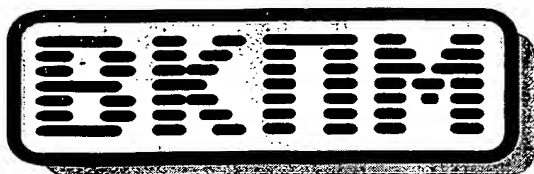
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.







# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7716

31 декабря 98

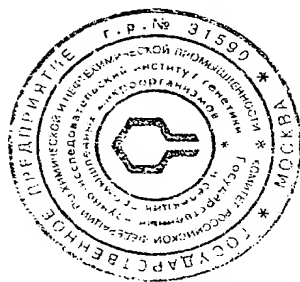
## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру *Escherichia coli* W3350 argE::Tn10(pKA10)(pYGGA)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: аргинин**

**Депозитор: ГосНИИ Генетика**



Зав. ВКПМ

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7716**

Appendix 3  
page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7716  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

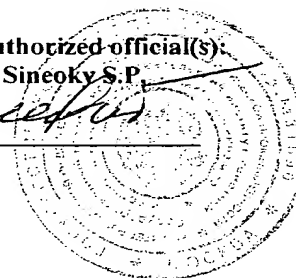
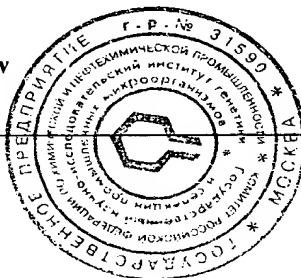
The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.



Appendix 3  
page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
!-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:
Escherichia coli W3350 argE::Tn10 (pKA10)(pYGGA)	VKPM B- 7716

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description      Producer of arginine

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

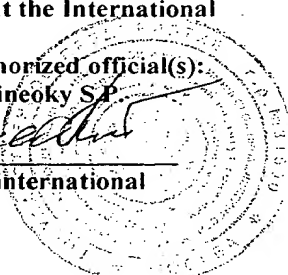
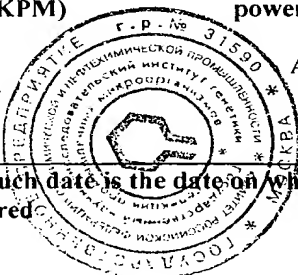
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

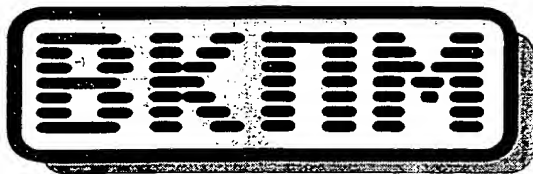
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7718

31 декабря 98

## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика**

**приняла на национальное патентное депонирование**

**29 декабря 1998 года**

**культуру *Escherichia coli* W3350 argE::Tn10(pKA10)(pOK12)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: аргинин**

**Депозитор: ГосНИИгенетика**



Зав. ВКПМ

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7718**

**To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
!-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor**

**INTERNATIONAL FORM**  
**receipt in the case of an original deposit**  
**issued pursuant to Rule 7.1 by the**  
**INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY**  
**identified at the bottom of this page**

**Identification reference given by the  
DEPOSITOR**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:  
VKPM B- 7718

The microorganism identified under I above was accompanied by:

           a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

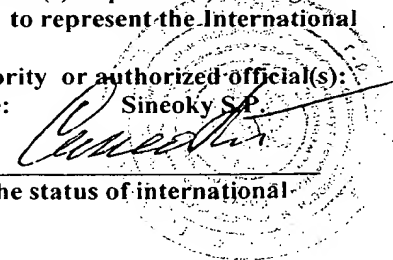
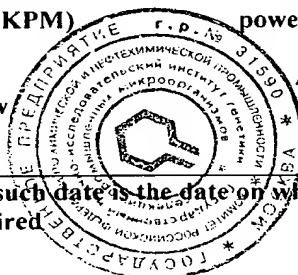
**This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)**

The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on \_\_\_\_\_ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on \_\_\_\_\_ (date of receipt of request for conversion)

**Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1**

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depository authority was acquired



Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7718  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

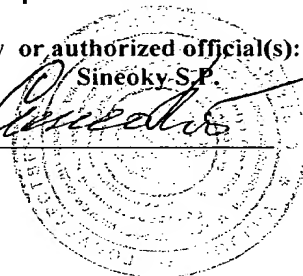
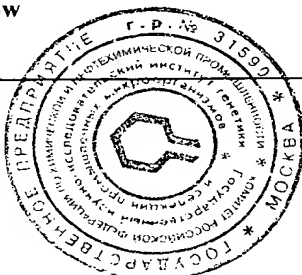
---

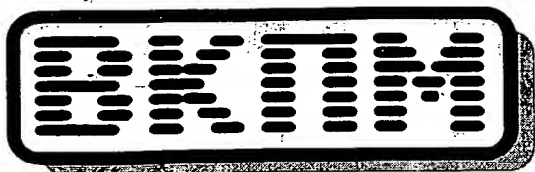
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7719

31 декабря 98

## СПРАВКА

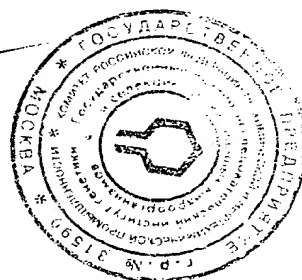
**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli VL614 (pYGGA)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: лизин**

**Депозитор: ГосНИИ Генетика**

Зав. ВКПМ



**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7719**

Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

---

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the <b>DEPOSITOR</b>  Escherichia coli VL614 (pYGGA)	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:  VKPM B-7719
---	---

---

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

  x   a scientific description                      Producer of lysine

       a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

---

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

---

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

---

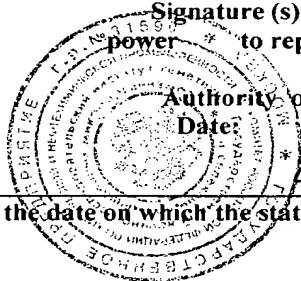
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.F.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired





**Appendix 3**  
**page 24**  
**Budapest treaty on the international**  
**recognition of the deposit of microorganisms**  
**for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

**INTERNATIONAL FORM**  
**VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY**  
**AUTHORITY**  
VKPM B-7719  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

---

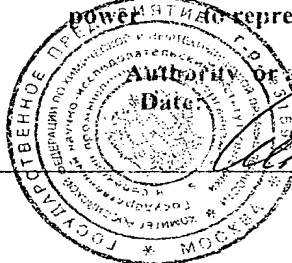
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

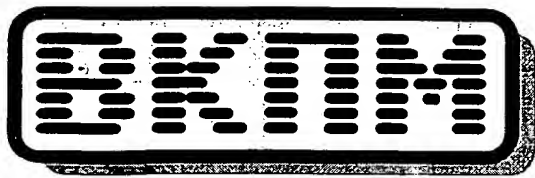
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7722

31 декабря 98

## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика**

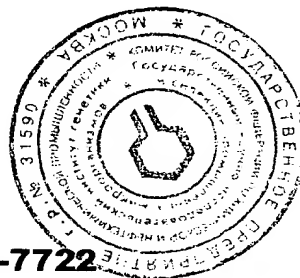
**приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру *Escherichia coli* VL614 (pOK12)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: лизин**

**Депозитор: ГосНИИ Генетика**

Зав. ВКПМ



**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7722**

**Appendix 3**  
**page 24**  
**Budapest treaty on the international**  
**recognition of the deposit of microorganisms**  
**for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

**INTERNATIONAL FORM**  
**VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY**  
**AUTHORITY**  
VKPM B-7722  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

---

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

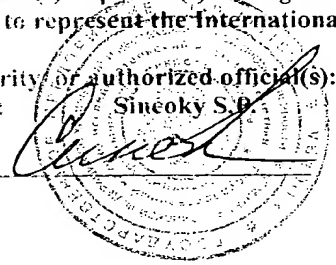
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date:

Sineoky S.D.



Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR

Escherichia coli VL614 (pOK12)

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:

VKPM E- 7722

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description

Producer of lysine

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,

1

which was received by it on 29.12.1998

(date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority

on

(date of original deposit) and a request to convert

the

original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on

(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

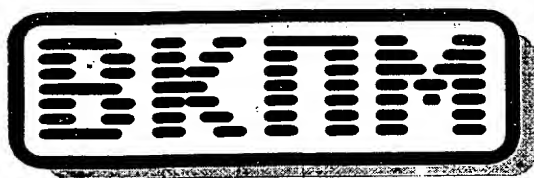
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineok, S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7728

31 декабря 98

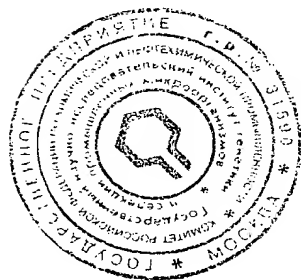
## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli AJ13199(pUC21)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: глютаминовая кислота**

**Депозитор: ГосНИИ Генетика**



**Зав. ВКПМ**

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7728**

**Appendix 3**

**page 24**

**Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

**INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY**  
VKPM B-7728  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

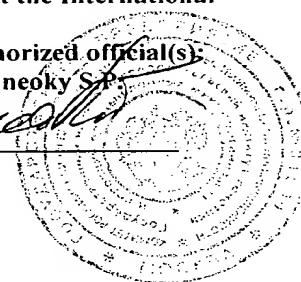
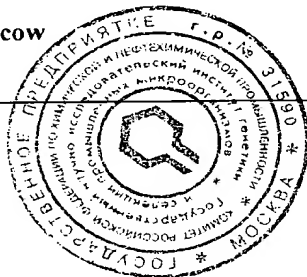
---

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
I Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineokiy S.P.



Appendix 3  
page 14  
**Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure**

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

**INTERNATIONAL FORM**  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

<b>Identification reference given by the DEPOSITOR</b>	<b>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:</b>
Escherichia coli AJ13199(pUC21)	VKPM B- 7728

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of glutamic acid  
  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

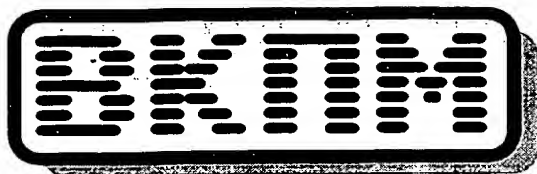
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International  
Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7729

31 декабря 98

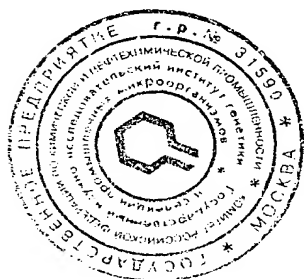
## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli AJ13199(pYAHN)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: глютаминовая кислота**

**Депозитор: ГосНИИ Генетика**



Зав. ВКПМ

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7729**



Appendix 3  
page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR

Escherichia coli AJ13199(pYAHN)

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:

VKPM B- 7729

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description

Producer of glutamic acid

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority on (date of original deposit) and a request to convert  
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineok S.P.

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depository authority was acquired

Appendix 3

page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7729  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

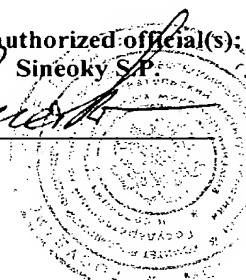
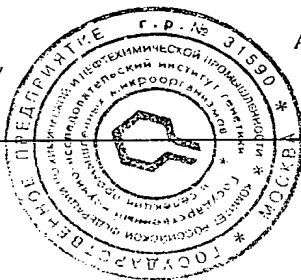
The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

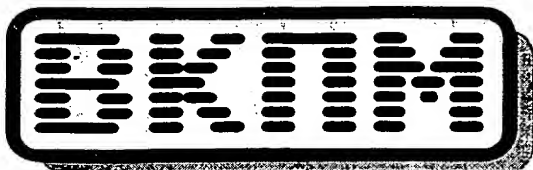
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7730

31 декабря 98

## СПРАВКА

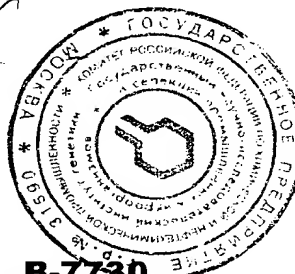
**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli AJ13199(pYFIK)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: глютаминовая кислота**

**Д позитор: ГосНИИгенетика**

Зав. ВКПМ



**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7730**

Appendix 3  
page 14  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

**I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM**

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:
Escherichia coli AJ13199(pYFIK)	VKPM B- 7730

**II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION**

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description                      Producer of glutamic acid  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

**III. RECEIPT AND ACCEPTANCE**

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

**IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION**

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature(s) of person(s) having the  
power to represent the International  
Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired

Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7730  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

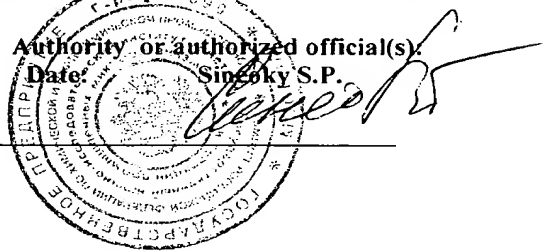
---

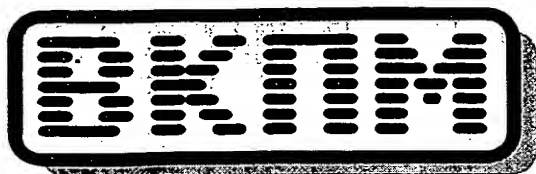
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s)  
Date: Singoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su.

7731

31 декабря 98

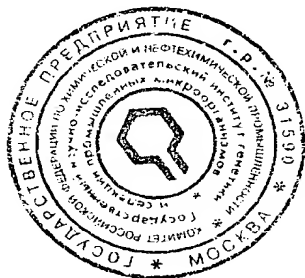
## СПРАВКА

**Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИГенетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года**

**культуру Escherichia coli AJ13199(pYEAS)**

**Продукт, синтезируемый штаммом: глютаминовая кислота**

**Депозитор: ГосНИИгенетика**



Зав. ВКПМ

**КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7731**

Appendix 3  
page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:
Escherichia coli AJ13199(pYEAS)	VKPM B- 7731

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description      Producer of glutamic acid  
☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority on (date of original deposit) and a request to convert  
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

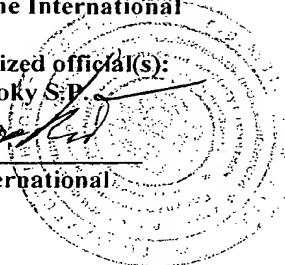
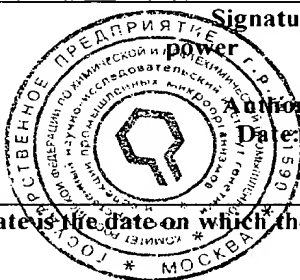
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineoky S.P.

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Appendix 3

page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7731  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

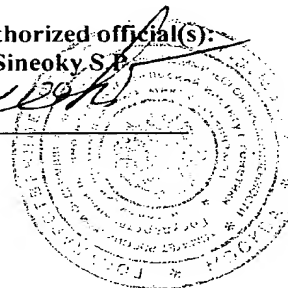
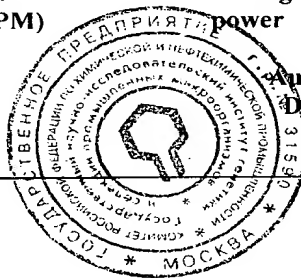
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

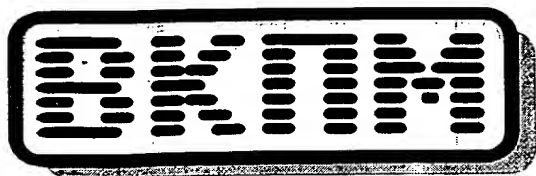
Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineoky S.P.







# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7748

31 декабря 98

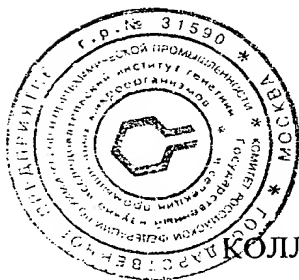
## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2151 (pYANN)

Продукт, синтезируемый штаммом: пролин

Депозитор: ГосНИИ Генетика



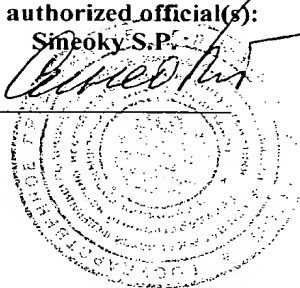
Зав. ВКПМ

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7748

**Budapest treaty on the international recognition of the deposit of microorganisms for the purposes of patent procedure**

**INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT**  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
**INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY**  
identified on the following page

**Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7748  
Date of deposit  
29. 12. 1998**



Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR

Escherichia coli VL2151 (pYAHN)

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:  
VKPM B- 7748

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description

Producer of proline

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority on (date of original deposit) and a request to convert  
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

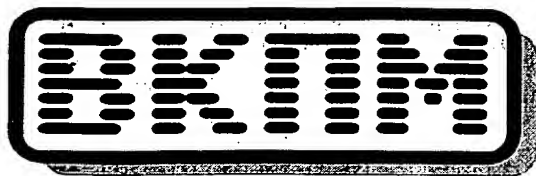
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su.

7752

31 декабря 98

## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика

приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2160 (pUC21)

Продукт, синтезируемый штаммом: гистидин

Депозитор: ГосНИИ Генетика



Зав. ВКПМ

*Синев*

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7752

Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR

Escherichia coli VL2160 (pUC21)

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:  
VKPM B- 7752

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description

Producer of histidine

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

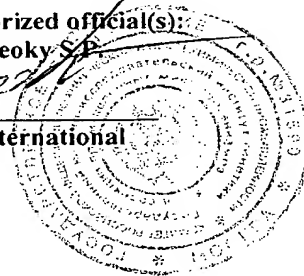
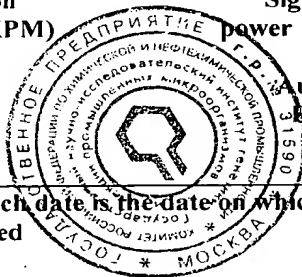
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.P.

I Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Appendix 3

page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7752  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

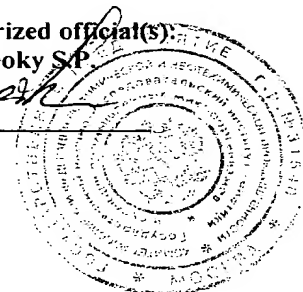
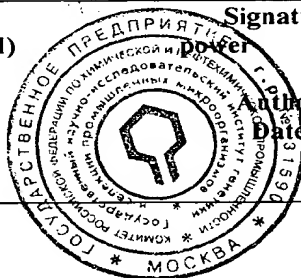
Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

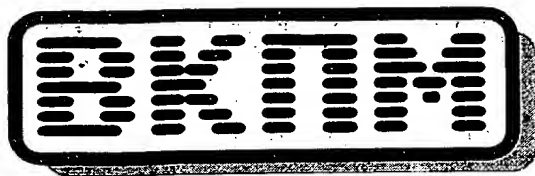
Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date:

Sineoky S.P.





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vniigen.msk.su;

7753

31 декабря 98

## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2160 (pYEAS)

Продукт, синтезируемый штаммом: гистидин

Депозитор: ГосНИИ Генетика

Зав. ВКПМ



КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7753

Appendix 3  
page 24  
Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

---

**I. DEPOSITOR**

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

---

**II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM**

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7753  
Date of deposit  
29. 12. 1998

---

**III. VIABILITY STATEMENT**

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

---

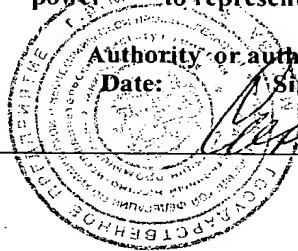
**V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY**

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):

Date: Sineoky S.P.





Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
.  
Moscow 113545  
!-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR

Escherichia coli VL2160 (pYEAS)

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY-  
AUTHORITY:  
VKPM B- 7753

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

  x   a scientific description

Producer of histidine

       a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
1 which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority  
on (date of original deposit) and a request to convert  
the  
original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

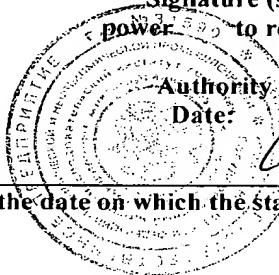
Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

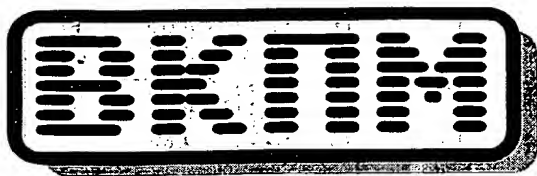
Authority or authorized official(s):

Date:

Sineoky S.P.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired





# Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

Россия, Москва, 113545, 1-ый Дорожный проезд, 1, ГНИИ Генетика - ВКПМ;  
(095) 3151210; факс: (095) 3150501; телекс: 411718 GENOM SU; Эл. почта: vkpm@vnigen.msk.su;

7754

31 декабря 98

## СПРАВКА

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов  
(ВКПМ), ГНИИ Генетика  
приняла на национальное патентное депонирование  
29 декабря 1998 года

культуру *Escherichia coli* VL2160 (pYFIK)

Продукт, синтезируемый штаммом: гистидин

Депозитор: ГосНИИ Генетика



Зав. ВКПМ

*Сенет*

КОЛЛЕКЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ В-7754

Appendix 3

page 14

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545  
1-st Dorozhny proezd 1 Russia  
name and address  
of depositor

INTERNATIONAL FORM  
receipt in the case of an original deposit  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY- AUTHORITY:
Escherichia coli VL2160 (pYFIK)	VKPM B- 7754

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ a scientific description      Producer of histidine

☐ a proposed taxonomic designation  
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above,  
I which was received by it on 29.12.1998 (date of original deposit)

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary  
Authority on (date of original deposit) and a request to convert  
the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on  
(date of receipt of request for conversion)

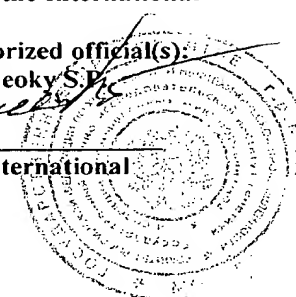
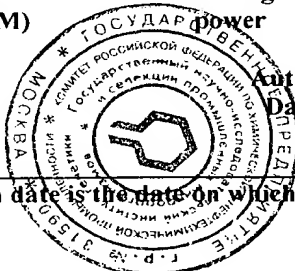
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depositary  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

Authority or authorized official(s):  
Date: Sineoky S.V.

1 Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international  
depositary authority was acquired



Appendix 3  
page 24

Budapest treaty on the international  
recognition of the deposit of microorganisms  
for the purposes of patent procedure

To  
State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA  
Moscow 113545 Russia

INTERNATIONAL FORM  
VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

name and address of the party  
to whom the viability statement  
is issued

I. DEPOSITOR

State Scientific Centre of  
Russian Federation  
GNIIGENETIKA

II. IDENTIFICATION OF THE  
MICROORGANISM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY  
AUTHORITY  
VKPM B-7754  
Date of deposit  
29. 12. 1998

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under above was tested  
On December 1998. On that date the said microorganism was viable

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Russian National Collection  
of Industrial Microorganisms (VKPM)  
Depository  
GNIIGenetika  
Address: Russia 113545 Moscow  
1 Dorozhny proezd 1

Signature (s) of person(s) having the  
power to represent the International

authority or authorized official(s):

Date:

Sineoky S.P.

